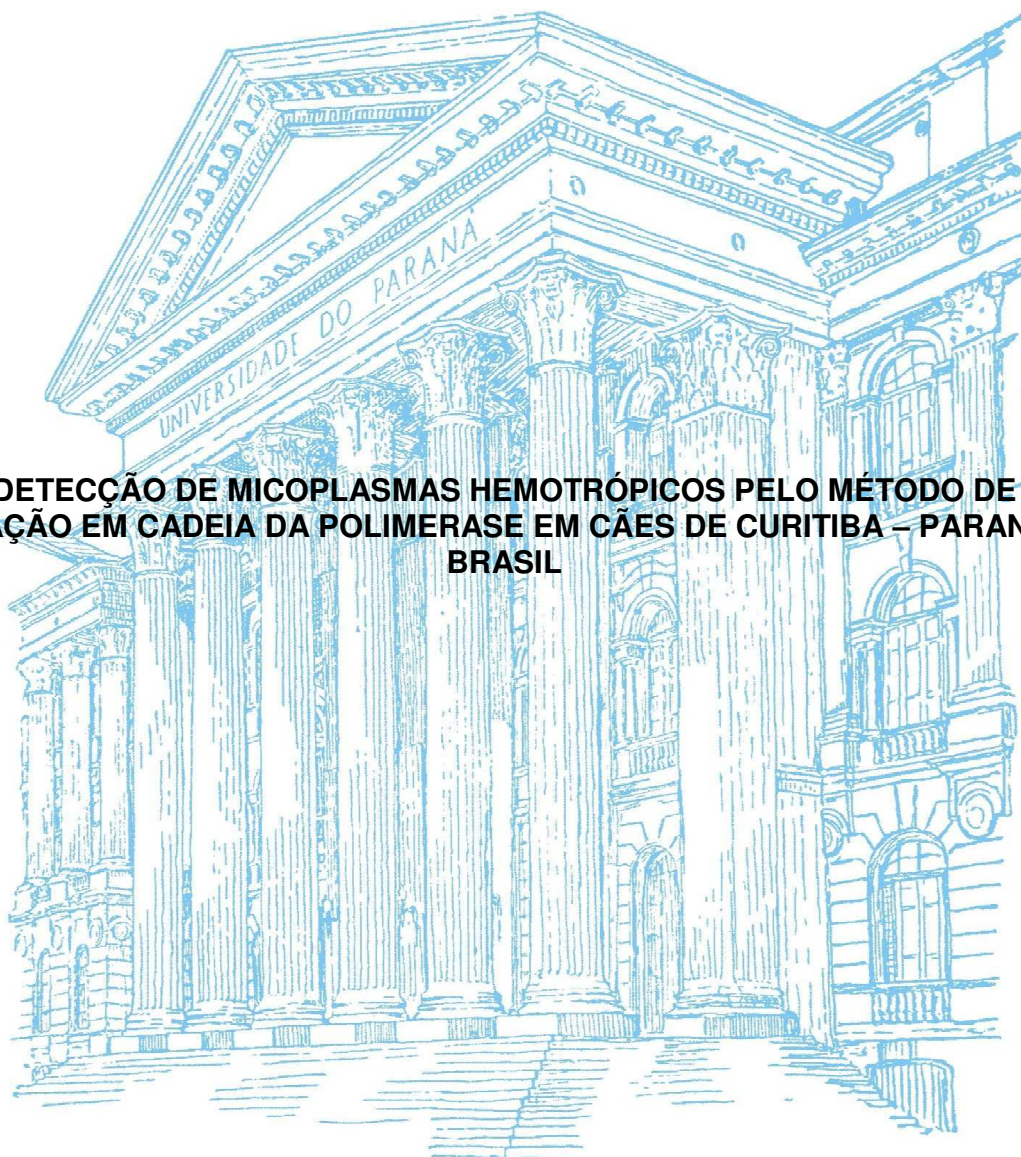


**UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ**

**MARCO ANTONIO BEUTING OSTROWSKI**

**DETECÇÃO DE MICOPLASMAS HEMOTRÓPICOS PELO MÉTODO DE  
REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE EM CÃES DE CURITIBA – PARANÁ -  
BRASIL**



**CURITIBA  
2009**



UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ  
SETOR DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS

DETECÇÃO DE MICOPLASMAS HEMOTRÓPICOS PELO MÉTODO DE  
REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE EM CÃES DE CURITIBA – PARANÁ -  
BRASIL

CURITIBA  
2009

MARCO ANTONIO BEUTING OSTROWSKI

DETECÇÃO DE MICOPLASMAS HEMOTRÓPICOS PELO MÉTODO DE  
REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE EM CÃES DE CURITIBA – PARANÁ -  
BRASIL

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-  
Graduação da Universidade Federal do Paraná  
para obtenção de título de Mestre.

Orientador: Prof. Dr. Antonio F. P. de F. Wouk

CURITIBA  
2009


PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS



PARECER

A Comissão Examinadora da Defesa da Dissertação intitulada "DETECÇÃO DE MICOPLASMAS HEMOTRÓPICOS PELO MÉTODO DE REACÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE EM CÃES DE CURITIBA - PARANÁ - BRASIL" apresentada pelo Mestrando MARCO ANTONIO BEUTING OSTROWSKI, declara ante os méritos demonstrados pelo Candidato, e de acordo com o Art. 78 da Resolução nº 62/03-CEPE/UFPR, que considerou o candidato ESTA APTO para receber o Título de Mestre em Ciências Veterinárias, na Área de Concentração em Patologia Veterinária.

Curitiba, 24 de março de 2009

  
Prof. Dr. Antonio Felipe P. de Figueiredo Wouk  
Presidente/Orientador

  
Prof. Dr. Alexander Weiker Blondo  
Membro

  
Prof. Dr. Marcelo Beltrão Molento  
Membro

Vimos ao mundo para dar nome às coisas.  
Dessa maneira nos tornamos senhores delas,  
Ou escravos de quem às batizou antes de nós.

Lya Luft

## **AGRADECIMENTOS**

Ao professor Alexander Welker Biondo, mentor deste projeto, pela amizade, confiança, viagens, incentivos e broncas que me fizeram crescer dentro da profissão de médico veterinário, pesquisador e professor.

Ao professor Antonio Felipe Paulino de Figueiredo Wouk, pela amizade dispensada, que em muitos momentos beirou a paternidade.

À professora Joanne B. Messick, da Universidade de Purdue, por aceitar receber parte do meu trabalho, e à colega Andréa Pires dos Santos, pelas dicas no trabalho e pelas reações em cadeia da polimerase.

Aos colegas Rafael Felipe “Prego” da Costa Vieira, Sandra Mara Rotter Curotto, Luiz Felipe M. Cavazzani, pelo companheirismo neste longo período do mestrado.

Aos veterinários do laboratório de análises clínicas Clinilab, Aline Baumann, Denise Kozemjakim, Lilia Mara de Souza, Claudia Custódio, por permitirem que utilizasse as amostras do laboratório para este estudo.

Aos meus pais, Antonio e Bernardete, cujos ensinamentos, carinho e amor me ensinaram a ser o homem que sou hoje.

À minha noiva, Roberta, que me ensinou que o vestibular era uma meta a ser alcançada, que foi às festas comigo durante toda a faculdade, que durante o período de residência e mestrado me agüentou nos períodos mais turbulentos, e que no futuro colherá comigo os frutos de tanta luta.

Aos meus irmãos, Juliano e Marcelo, pelo companheirismo nos momentos caseiros.

## RESUMO

Os micoplasmas hemotrópicos são bactérias gram negativas, em forma de cocos, anéis ou bacilos, que parasitam eritrócitos de uma grande variedade de mamíferos, entre eles os cães. A hemoplasmosse nos cães é geralmente um achado laboratorial. Raramente cães sem comprometimento imunológico ou não esplenectomizados desenvolvem a infecção. Os sinais da doença incluem febre, anorexia, mucosas pálidas e a anemia, quando presente, é discreta a moderada. A hemoplasmosse nos cães é causada pelas bactérias *Mycoplasma haemocanis* (Mhc) e “*Candidatus Mycoplasma haematoparvum*” (CMhp). A transmissão ocorre pelo repasto do carrapato *Rhipicephalus sanguineus*, transfusão sanguínea, transmissão vertical de cadela para filhotes foi reportada, porém não há certeza se é transmitido por via placentária ou no momento do parto. O diagnóstico é feito pela visualização do agente infeccioso sobre a membrana eritrocitária ao exame do esfregaço sanguíneo, sem identificação da espécie de micoplasma. O diagnóstico pela reação em cadeia da polimerase (PCR) é considerado padrão ouro por ter maior sensibilidade e especificidade que a citologia. O PCR para hemoplasmas é feito com a amplificação dos genes 16SrRNA e rnpB. O sequenciamento destes genes permite a identificação entre as espécies de hemoplasmas caninos e felinos. Foram realizados testes em 99 amostras de sangue de cães provenientes de um laboratório comercial da cidade de Curitiba. Foi realizada a extração do DNA e PCR para os genes GAPDH, gene constitutivos que garantem a qualidade de extração, 16SrRNA para *Mycoplasma haemofelis* (Mhf) “*Candidatus Mycoplasma haemominutum*” (CMhm) e “*Candidatus Mycoplasma turicensis*” (CMtc). Das 94 amostras positivas para o GAPDH, 16 (17,02%) geraram amplicons para pelo menos uma das três espécies testadas, nenhuma amostra apresentou co-infecção com mais de uma espécie. Do total de amostras, 9/94 (9,57%) foram positivos para Mhc, 4/94 (4,26%) para CMhp e 3/94 (3,19%) para CMTC, num total de 16 amostras positivas. Destas, 13 pertenciam ao grupo de 64 anêmicos (20,31%) e as outras 3 ao grupo de 30 não anêmicos (10,0%), com o dobro de risco de animais anêmicos possuírem a infecção. Um total de 10/46 (21,74%) machos foram positivos e 6/48 (12,5%) fêmeas foram positivas para hemoplasmas, indicando maior probabilidade de machos serem positivos. Um total de 2/18 animais com até 12 meses (11,12%) foram positivos, e 14/76 com mais de 12 meses (18,42%) foram positivos, mostrando maiores chances de cães com mais de 12 meses serem positivos. Não houve diferença significativa entre as idades dos animais positivos e negativos, e entre os hematócritos dos cães anêmicos e cães não anêmicos. Porém houve diferença significativa entre a presença de hemoplasmas e anemia, indicando que os hemoplasmas podem causar anemia em cães. Relata-se pela primeira vez a presença de “*Candidatus Mycoplasma turicensis*” em cães em Curitiba, Brasil.

Palavras-chave: Cão, micoplasmas hemotrópicos, PCR, anemia



## ABSTRACT

Hemotropic mycoplasmas are gram negative, coccoid, ring or rod shaped bacteria, which parasite erythrocytes of a wide variety of mammals, including dogs. Hemoplasmosis in dogs is often a laboratory finding. Dogs without immunological restraint or non-splenectomized rarely develop the infection. Signs of disease include fever, anorexia, pale mucous membranes and anemia, when present, is mild to moderate. Hemoplasmosis in dogs is caused by bacteria *Mycoplasma haemocanis* (Mhc) and "*Candidatus Mycoplasma haematoparvum*" (CMhp). Transmission occurs by *Rhipicephalus sanguineus* tick feeding, blood transfusion, vertical transmission from bitch to offspring has been reported, however trans-placental or at birth transmission has not been elucidated yet. Diagnosis is made by visualization of infectious agent on the erythrocyte membrane over blood smear examination, with no species identification. Diagnosis of polymerase chain reaction (PCR) is considered the gold standard due to higher sensitivity and specificity than cytology. Hemoplasma PCR is performed by 16SrRNA and rnpB gene amplification. Sequencing of these genes may allow to species identification between canine and feline hemoplasmas. A total of 99 samples were tested in dogs from a commercial laboratory in Curitiba, Brazil. DNA extraction and PCR for GAPDH housekeeping gene, which insures quality control of extraction, 16SrRNA for *Mycoplasma haemofelis* (Mhf) "*Candidatus Mycoplasma haemominutum*" (CMhm) and "*Candidatus Mycoplasma turicensis*" (CMtc). Out of 94 positive samples for GAPDH, 16/94 (17.02%) produced amplicons of at least one of three tested species, and no sample presented co-infection with more than one species. A total of 9/94 (9.57%) were positive for Mhc, 4/94 (4.26%) for CMhp and 3/94 (3.19%) for CMtc. Out of 16 positive samples, 13 were from the 64 anemic group (20.31%) and other 3 were from the 30 non-anemic group (10.0%), showing a double likelihood of anemic dogs to have the infection. A total of 10/46 dogs (21.74%) were positive, and 6/48 (12.5%) were positive for hemoplasmas, showing higher chances of males to be positive. According to age, 2/18 animals younger than 12 months of age (11.12%) were positives and 14/76 older than 12 months (18.42%) were positive, showing higher chances of older dogs to be positive. No significant differences were found between ages and positive/negative animals, and between packed cell volume of anemic and non-anemic dogs. However a significant difference was found between presence of hemoplasma and anemia, showing that hemoplasmas may cause anemia in dogs. "*Candidatus Mycoplasma turicensis*" has been reported for the first time infecting dogs in Curitiba, Brazil.

Palavras-chave: dog, hemotropic hemoplasma, PCR, anemia

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

**GRÁFICO 01** – Número de animais positivos para a amplificação do gene gapdh e gene 16srrna para os hemoplasmas *Mycoplasma haemocanis*, “*Candidatus Mycoplasma haematoparvum*” e “*Candidatus Mycoplasmas turicensis*”.....24

## LISTA DE TABELAS

### CAPÍTULO I

<b>TABELA 01 - MICOPLASMAS HEMOTRÓPICOS E SEUS HOSPEDEIROS ESPECÍFICOS.....</b>	<b>07</b>
---	-----------

### CAPÍTULO II

<b>TABELA 01 – Quantidade de animais positivos e negativos, divididos por grupo de sexo, presença de anemia, idade e valores de qui-quadrado e p, em 94 cães da cidade de Curitiba.....</b>	<b>40</b>
---	-----------

<b>TABELA 02 – Hematócrito mínimo, máximo, médio e desvio padrão (dp) de 64 cães anêmicos positivos e negativos à presença de hemoplasmas, <i>Mycoplasma haemocanis</i> (Mhc), “<i>Candidatus Mycoplasma haematoparvum</i>” (CMhp) e “<i>Candidatus Mycoplasmas turicensis</i>” (CMtc) pela técnica de reação em cadeia da polimerase (PCR) para o gene 16SrRNA, da cidade de Curitiba.....</b>	<b>40</b>
---	-----------

<b>TABELA 03 – Valores mínimos, máximos, media e desvio padrão dos hematócritos, em porcentagem, de cães da cidade de Curitiba analisados para presença do gene GAPDH, dos cães do grupo anêmicos e do grupo não anêmicos, dos grupos machos e fêmeas, e com idade entre 1 e 12 meses e de cães acima de 12 meses, para população de positivos e negativos para hemoplasmas.....</b>	<b>41</b>
--	-----------

<b>TABELA 04 – Valores mínimos, máximos, media e desvio padrão da idade, em meses, de cães da cidade de Curitiba analisados para presença do gene GAPDH, dos cães do grupo anêmicos e do grupo não anêmicos, dos grupos machos e fêmeas, e com idade entre 1 e 12 meses e de cães acima de 12 meses, para população de positivos e negativos para hemoplasmas.....</b>	<b>42</b>
--	-----------

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

16SrRNA – gene que codifica a subunidade 16S do RNA ribossômico

bp – pares de base

C.M. – *Candidatus Mycoplasma*

CDME – Centro de Diagnóstico Marcos Enrietti

CMhm – “*Candidatus Mycoplasma haemominutum*”

CMhp – “*Candidatus Mycoplasma haematoparvum*”

CMtc – “*Candidatus Mycoplasma turicensis*”

DNA – ácido desoxirribonucléico

dNTP – trifosfato de desoxinucleosídeo

EDTA – ácido etileno-diamino-tetra-acético

GAPDH – gene que codifica a enzima Gliceraldeído-3-Fosfato Desidrogenase

HIV – Vírus da Imunodeficiência Humana

IFI – imunofluorescência indireta

IV – intravenosa

M. – *Mycoplasma*

MgCl<sub>2</sub> - Cloreto de Magnésio

Mhc – *Mycoplasma haemocanis*

Mhf – *Mycoplasma haemofelis*

PCR – Reação em Cadeia da Polimerase

PO – via oral

rnpB – gene rnpB

spp. – espécies

U – unidade

## SUMÁRIO

I. INTRODUÇÃO .....	1
1. Objetivos Gerais.....	2
2. Objetivos Específicos.....	2
II. MICOPLASMAS HEMOTRÓPICOS EM CÃES: REVISÃO.....	3
RESUMO .....	3
ABSTRACT .....	4
1. INTRODUÇÃO .....	5
2. HISTÓRICO .....	6
3. MORFOLOGIA .....	8
4. TRANSMISSÃO .....	9
5. ADESÃO E LESÃO ERITROCITÁRIA.....	9
6. SINAIS CLÍNICOS.....	10
7. DIAGNÓSTICO .....	11
8. PREVALÊNCIA .....	12
9. TRATAMENTO.....	13
10. CONCLUSÕES .....	13
11. REFERÊNCIAS .....	13
III. DETECTION OF HEMOTROPIC HEMOPLASMAS IN DOGS OF CURITIBA – PARANÁ - BRAZIL.....	20
INTRODUCTION.....	21
MATERIAL AND METHODS .....	22

Animals and Samples.....	22
Hematological Analysis .....	23
Polymerase Chain Reaction (PCR) .....	23
Statistical Analysis.....	25
RESULTS.....	25
DISCUSSION .....	27
CONCLUSIONS.....	30
REFERENCES .....	30
IV. CONCLUSÕES FINAIS.....	34
V. REFERÊNCIAS.....	35
VI. ANEXOS.....	42

## I. INTRODUÇÃO

Micoplasmas hemotrópicos (hemoplasmas) são bactérias pleomórficas, de forma cocóide, de anel ou bastonete e gram negativas (MESSICK, 2004). Parasitas obrigatórios de membrana de eritrócitos de grande variedade de espécies animais, podem causar doenças relacionadas à destruição destas hemácias parasitadas, ocorrendo a hemólise intravascular ou hemólise extravascular (HARVEY, 2006). Fatores de risco como esplenectomia e imunossupressão e co-infecção podem desenvolver a infecção (MESSICK, 2004). Animais podem estar infectados com mycoplasmas de outras espécies, sem que desenvolvam a doença, mostrando a especificidade de cada mycoplasma.

O diagnóstico dos hemoplasmas pode ser feito pela visualização do agente aderido à membrana eritrocitária no exame do esfregaço sanguíneo de rotina, sendo geralmente um achado em cães, visto que a doença em cães saudáveis (não esplenectomizados ou imunocompetentes) é rara (TASKER, 2006). A utilização da reação em cadeia da polimerase (PCR) é mais sensível e mais específica pois detecta o material genético das bactérias no sangue de cães.

Em cães, as espécies de hemoplasmas encontradas são *Mycoplasma haemocanis* (Mhc) e “*Candidatus Mycoplasma haematoparvum*” (CMhp).

Existem poucos estudos sobre prevalência de hemoplasmoses em cães. Na França, 460 cães foram testados para o gene 16SrRNA por PCR em tempo real. 71 (15,4%) foram positivos, com 44 (9,6%) para CMhp, 15 (3,3%) para Mhc, e 12 (2,6%) para ambos (KENNY *et al.*, 2004). Na Suíça, 889 cães foram testados, com 8 (0,9%) positivos para Mhc, e 3 (0,3%) para CMhp, sem co-infecção (WENGI *et al.*, 2008).

**1.1. OBJETIVOS GERAIS**

Avaliar a presença de anemia, e correlacionar idade e sexo com a infecção por hemoplasmas.

**1.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

Verificar a presença das espécies de hemoplasmas na população de cães na cidade de Curitiba – Paraná - Brasil.



## II. MICOPLASMAS HEMOTRÓPICOS EM CÃES: REVISÃO

### RESUMO

Micoplasmas hemotrópicos são bactérias de forma cocóide, de anéis ou bastonete e gram negativas, que parasitam eritrócitos de grande variedade de animais, causando destruição das hemácias por hemólise intravascular ou extravascular. Fatores de risco como esplenectomia e imunossupressão e co-infecção desenvolvem a doença. Em cães saudáveis (não esplenectomizados ou imunocompetentes), a infecção raramente desenvolve. Em cães, as espécies encontradas são *Mycoplasma haemocanis* (Mhc) e “*Candidatus Mycoplasma haematoparvum*” (CMhp). Na França, 460 cães foram testados para o gene 16SrRNA por PCR em tempo real e 71 (15,4%) positivos para hemoplasmas com 44 (9,6%), 15 (3,3%) e 12 (2,6%) para CMhp, Mhc e co-infectados com os dois hemoplasmas, respectivamente. Na Suíça, 889 cães foram testados, com 8 (0,9%) positivos para Mhc, e 3 (0,3%) para CMhp, sem co-infecção. Outro estudo mostrou infecção em 3 canis comerciais na Europa e Estados Unidos, com infecção de 30%, 35% e 87%, mostrando ser uma doença comum em locais com grandes densidade de animais. O diagnóstico pode ser utilizado por microscopia óptica, com parasitas aderidos à superfície dos eritrócitos, e reação em cadeia da polimerase (PCR), considerada de alta sensibilidade e especificidade. O tratamento é feito à base de tetraciclina, marbofloxacina e enrofloxacina. Tratamento de suporte como transfusão sanguínea deve ser realizado quando essencial para sobrevivência do paciente. Mesmo com tratamento o cão pode ser reservatório da doença pelo resto da vida.

**Palavras chave:** micoplasma, anemia, PCR

## ABSTRACT

Hemotropic mycoplasmas are coccoid bacteria, ring or rod shape and gram negative, which parasite erythrocytes of a wide variety of species, causing destruction of red blood cells by intravascular or extravascular hemolysis. Risk factors as splenectomy and immunosuppression with co-infection develop the disease. In healthy dogs (non splenectomized or immunocompetents), the infection rarely progresses. In dogs, species of hemoplasmas found are *Mycoplasma haemocanis* (Mhc) and "*Candidatus Mycoplasma haematoparvum*" (Mhp). There are few studies on the prevalence of hemoplasmosis in dogs. In France, 460 dogs were tested for 16S rRNA gene by real time PCR. A total of 71 (15.4%) were positives, with 44 (9.6%) for Mhp, 15 (3.3%) for Mhc, and 12 (2.6%) for both. In Switzerland, 889 dogs were tested, with 8 (0.9%) positives for Mhc, and 3 (0.3%) for Mhp, with no co-infection occurrence. Another study has shown infection of 3 commercial in Europe and United States, with infection of 30%, 35% and 87% of infection, showing that the disease is common in high density animal places. Diagnosis may be reached by optical microscopy, with parasites adhered to erythrocyte surface anti-Mhc antibodies, however with cross reaction with *Rickettsia conorii*, and polymerase chain reaction (PCR), considered of high sensitivity and specificity.. Treatment is made based on tetracycline, marbofloxacin and enrofloxacin. Support treatment such as blood transfusion should be made when essential for patient survival. Even with treatment, dogs may persist as disease reservoirs for lifetime.

**Key words:** mycoplasma, anemia, PCR

## 1. INTRODUÇÃO

Micoplasmas hemotrópicos (hemoplasmas) são bactérias pleomórficas, de forma cocóide, anel ou bastonete, gram negativas e apresentam de 0,3 a 2,0 µm de diâmetro (MESSICK, 2004). São parasitas obrigatórios da membrana de eritrócitos e podem causar destruição das hemácias parasitadas, ocorrendo hemólise intra ou extravascular (HARVEY, 2006).

Em cães, *Mycoplasma haemocanis* (*Haemobartonella canis*) (Mhc) e '*Candidatus Mycoplasma haematoparvum*' (CMhp) são as espécies já descritas (MESSICK, 2004). Dentre os sinais clínicos a anemia causada pela infecção é regenerativa. Fatores de risco como esplenectomia, transfusão sanguínea, imunossupressão e co-infecção com outros agentes infecciosos podem contribuir para o desenvolvimento da infecção e aparecimento dos sinais clínicos, cães imunocompetentes e não esplenectomizados raramente desenvolvem doença, tornando-se portadores e reservatórios assintomáticos (GRETILLAT, 1981; HOSKINS, 1991; LESTER *et al.*, 1995; BRINSON & MESSICK, 2001; MESSICK, 2004).

O diagnóstico da infecção é baseado na visualização do hemoparasita sobre os eritrócitos à microscopia óptica. A reação em cadeia da polimerase (PCR), tem maior sensibilidade e especificidade, pois identifica o DNA (ácido desoxirribonucléico) bacteriano no sangue canino, sendo considerado o teste ouro para o diagnóstico da infecção (KEMMING *et al.*, 2004a).

Há poucos estudos sobre prevalência de hemoplasmoses em cães em todo o mundo. Na França, 460 cães foram testados para a presença das duas espécies descritas em cães utilizando PCR em tempo real, observou-se que 71 (15,4%) animais foram positivos. Na Suíça, 889 cães foram testados pela PCR em tempo real, sendo encontrados 11 (1,23%) positivos para hemoplasmas. INOKUMA *et al.* (2006) encontrou em cães no Sudão 25/78 (32,05%) de cães infectados com hemoplasmas. KEMMING *et al.* (2004b) identificou a infecção em três canis comerciais da Europa e Estados Unidos, com frequência de 30%, 35% e até 87% nos animais, sugerindo que a hemoplasmoses em cães que vivem em conjunto apresentam maior probabilidade de transmissão da doença. O tratamento dos animais infectados ocorre com terapia de

suporte, com transfusão sanguínea nos pacientes com anemia severa, e uso de antibióticos como enrofloxacin, marbofloxacin e tetraciclina (KEMMING *et al.*, 2004a; ISHAK *et al.*, 2008).

## 2. HISTÓRICO

Micoplasmas são um grupo de bactérias que parasitam grande quantidade de animais, entre aves, répteis e mamíferos. As células parasitadas por estas bactérias incluem trato respiratório, urogenital, gastroentérico e eritrócitos. Possuem o menor genoma conhecido do reino animal. Sua dupla fita de DNA possui somente genes essenciais à vida, capazes de síntese protéica, reprodução e transcrição (CHALKER, 2005).

Em 1928 KIKUTH identificou o microorganismo e o nomeou *Bartonella canis*. Em 1959, BENJAMIM & LUMB identificaram-na como agente causadora de uma doença hemolítica e a renomearam *Haemobartonella canis*. Devido a características como parasitismo obrigatório na membrana do eritrócito hospedeiro, sem penetração no interior do eritrócito, pequeno tamanho, coloração gram-negativa, transmissão por carrapatos, e incapacidade de crescimento em meios de cultura (RISTIC & KREIER, 1984), a *Haemobartonella canis* foi classificada como sendo pertencente à ordem *Rickettsiales*, gênero *Anaplasmataceae*. Porém existia-se uma suspeita de que esses microrganismos não se tratavam de rickettsias e estavam mais relacionadas à classe Mollicutes. Isto se baseava na ausência de parasitismo intracelular, seu pequeno tamanho, ausência de parede celular e flagelo, resistência a penicilina e susceptibilidade à tetraciclina (MESSICK, 2003). Com base na análise das seqüências do gene 16SrRNA, as hemobartonelas foram reclassificadas para o gênero *Mycoplasma* (NEIMARK *et al.*, 2001), classe Mollicutes e passou a ser chamada *Mycoplasma haemocanis* comb. nov. (MESSICK *et al.*, 2002).

Em 2004 uma nova espécie de hemoplasma foi identificada em um cão portador de neoplasia linfóide e esplenectomizado chamada "*Candidatus Mycoplasma haematoparvum*" (SYKES *et al.*, 2004, 2005). O termo "*Candidatus*" se deve ao fato da

nova espécie não ser totalmente descrita, conferindo status provisório de *Mycoplasma* para a nova espécie (NEIMARK *et al.*, 2002).

A relação espécie-específica dos micoplasmas hemotrópicos é bem definida. Muitas espécies de micoplasmas hemotrópicos são relatadas em diversas espécies de mamíferos (TABELA 01).

**TABELA 01 – MICOPLASMAS HEMOTRÓPICOS E SEUS HOSPEDEIROS ESPECÍFICOS.**

Mycoplasma hemotrópico	Hospedeiro	Referência
<i>Mycoplasma haemocanis</i>	<i>Canis familiaris</i> <sup>5</sup>	MESSICK, 2004
<i>Mycoplasma haemofelis</i>	<i>Felis catus</i> <sup>5</sup>	MESSICK, 2004
<i>Mycoplasma suis</i>	<i>Sus Scrofa</i> <sup>1</sup>	HOELZLE <i>et al.</i> , 2003
<i>Mycoplasma wenyonii</i>	<i>Bos taurus</i> <sup>2</sup>	TAGAWA <i>et al.</i> , 2008
<i>Mycoplasma ovis</i>	Ovinos e caprinos <sup>6</sup>	NEIMARK <i>et al.</i> , 2004
<i>Candidatus Mycoplasma haematoparvum</i>	<i>Canis familiaris</i> <sup>5</sup>	MESSICK, 2004
<i>Candidatus Mycoplasma haemominutum</i>	<i>Felis catus</i> <sup>5</sup>	MESSICK, 2004
<i>Candidatus Mycoplasma turicensis</i>	<i>Felis catus</i> <sup>5</sup>	MESSICK, 2004
<i>Candidatus Mycoplasma haemobos</i>	<i>Bos taurus</i> <sup>2</sup>	TAGAWA <i>et al.</i> , 2008
<i>Candidatus Mycoplasma haemodidelphidis</i>	<i>Didelphis albiventris</i> <sup>3</sup>	MESSICK <i>et al.</i> , 2002
<i>Candidatus Mycoplasma haemolamae</i>	<i>Llama pacos</i> <sup>3</sup>	MESSICK <i>et al.</i> , 2002
<i>Candidatus Mycoplasma haemomuris</i>	<i>Rattus norvegicus</i> <sup>4</sup>	NEIMARK <i>et al.</i> , 2001

Entretanto esta relação pode ser alterada quando o hospedeiro apresenta alterações no sistema imunológico. Sangue de cães infectados com Mhc ao ser injetado por via intravenosa (IV) em gatos, não causou doença hemolítica, porém o

sangue destes gatos injetados em cães esplenectomizados provocou anemia, mostrando que gatos podem ser portadores de hemoplasmose canina (LUMB, 2001). Quando há comprometimento imunológico, micoplasmas não hemotrópicos podem causar infecção em hospedeiros não específicos, ocorrendo infecções entre animais e entre seres humanos e animais domésticos (PITCHER & NICHOLAS, 2005). Entre as doenças relacionadas a micoplasmose em pacientes imunocomprometidos estão doenças reumáticas, artrite reumatóide e lupus eritematoso sistêmico (TAYLOR-ROBINSON & SCHAEVERBEKE, 1996). SANTOS *et al.* (2008) relatam um paciente HIV positivo com anemia e positivo para Mhf.

### 3. MORFOLOGIA

Hemoplasmas são bactérias gram negativas, visualizadas na microscopia óptica e eletrônica sob a forma de cocos, anéis ou alongados. Na superfície da membrana eritrocitária aparecem isoladas ou agrupadas em formas de arco (VENABLE & EWING, 1968; BIRKENHEUER *et al.*, 2002; MESSICK, 2002, 2003). Sua reprodução ocorre provavelmente por divisão binária (MESSICK, 2004; HARVEY, 2006). As diferentes formas podem ser consequência do processo de crescimento e divisão (VENABLE & EWING, 1968). *Mycoplasma haemocanis* tem 0.3-2.0 µm de diâmetro. É geralmente encontrado formando cadeias de microorganismos na membrana do eritrócito, quando visualizado na microscopia óptica (MESSICK *et al.*, 2002; HARVEY, 2006). “*Candidatus Mycoplasma haematoparvum*” tem 0.3 µm de diâmetro e aparece de forma isolada na superfície dos eritrócitos (SYKES *et al.*, 2005). Até recentemente não havia dados que mostrassem que os hemoplasmas conseguissem penetrar a membrana celular, infectando somente sua superfície (MESSICK, 2004), porém GROELBEL *et al.*, (2009) relatam a presença do *Mycoplasma suis* dentro do eritrócito de suínos, abrindo espaço para mais estudos quanto ao ciclo, reprodução e tratamento desta infecção.

#### 4. TRANSMISSÃO

A transmissão de Mhc foi relatada experimentalmente durante o repasto sanguíneo do carrapato *Rhipicephalus sanguineus* (SENEVIRATNA *et al.*, 1973). A transmissão transtadial e transovariana do Mhc entre carrapatos pode ocorrer, mostrando a importância do carrapato como transmissor e como reservatório da doença. Transfusão de sangue de animais infectados, porém clinicamente saudáveis, além da ingestão de sangue contaminado constituem outra importante fonte de transmissão da hemoplasmose em cães (HARVEY, 2006). No Japão, carrapatos *Ixodes ovatus* e *Haemaphysalis flava* que não fizeram repasto foram positivos para PCR para “*Candidatus Mycoplasma turicensis*” coletados da vegetação das cidades de Hokkaido, Fukushima e Yamaguchi (TAROURA *et al.*, 2005). LUMB (2001) mostrou que gatos podem ser reservatórios da hemoplasmose canina, quando injetou em gatos sangue de cães positivos para Mhc. Estes gatos não desenvolveram a doença e quando tiveram seu sangue injetado em cães esplenectomizados, foram capazes de causar doença hemolítica nos cães receptores.

#### 5. ADESÃO E LESÃO ERITROCITÁRIA

O mecanismo de adesão dos hemoplasmas ainda não está bem reconhecido (MESSICK, 2004). A adesão dos micoplasmas pode causar alterações na membrana que levam a sua destruição. Essas modificações ocorrem pela incapacidade dos micoplasmas de metabolizar lipídios, tendo que retirá-los da membrana das células parasitadas (RAZIN, 1978). Outro fator é a ação de produtos do metabolismo dos micoplasmas como o peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ), que causa peroxidação dos lipídios da membrana, tornando-a frágil e sensível a alterações de pressão e deformidade quando passam por capilares sanguíneos (BASEMAN *et al.*, 1982). Os hemoplasmas são obrigados a retirar das células hospedeiras todo amino-ácido, ácidos graxos, colesterol e vitaminas necessários à formação da membrana bacteriana (MESSICK, 2004).

A presença de auto-anticorpos contra eritrócitos após esplenectomia e corpúsculos compatíveis com hemoplasmas em eritrócitos foi relatada por BUNDZA *et al.*, (1976), mostrando a produção de anticorpos estimulada pela presença de hemoplasmas sobre a membrana eritrocitária. O hematócrito pode diminuir como resposta do sistema imune com a retirada temporária dos eritrócitos parasitados da circulação por macrófagos do baço, fígado, medula óssea e pulmões, e após a saída dos micoplasmas da membrana celular estas células voltam à circulação sanguínea. Explicando a flutuação no hematócrito de felinos e na visualização dos microrganismos no esfregaço sanguíneo. Outra causa de anemia seria a fixação do sistema complemento aos anticorpos aderidos à membrana eritrocitária levando a hemólise intravascular. A flutuação na população de parasitas na superfície dos eritrócitos também causaria dano constante, diminuindo a vida útil da célula, levando a anemia (HARVEY, 2006).

## 6. SINAIS CLÍNICOS

A hemoplasmosose raramente causa doença em cães não-esplenectomizados ou imunocompetentes, tornando-se então portadores assintomáticos (MESSICK, 2004). Em cães imunossuprimidos ou esplenectomizados ficou evidenciada palidez de mucosa, temperatura retal normal ou aumentada, anorexia e perda de peso (NORTH, 1978; LESTER *et al.*, 1995; MESSICK, 2004; HARVEY, 2006).

A anemia causada pela infecção é regenerativa, com evidencia de reticulocitose, anisocitose, policromatofilia, eritrócitos nucleados circulantes e corpúsculos de Howell-Jolly, macrocitose é encontrada em fases mais avançadas. O leucograma pode apresentar leucopenia (KEMMING *et al.*, 2004a), não apresentar alterações (HARVEY, 2006) ou leucocitose com desvio a esquerda (GRETILLAT, 1981).

Fatores de risco para o desenvolvimento da doença em cães são co-infecções com *Ehrlichia spp.* *Babesia spp.* (HOSKINS, 1991) e parvovirus (GRETILLAT, 1981), idade, imunossupressão e esplenectomia (MESSICK, 2004). MORAIS *et al.*, (2003) observaram um cão não esplenectomizado apresentando sorologia positiva para *Babesia canis* e PCR positivo para Mhc, sem a presença de anemia. Pode ocorrer o



desenvolvimento da doença em animais imunossuprimidos com corticosteróides (HANDCOCK, 1989). BRINSON & MESSICK (2001) identificaram um cão esplenectomizado com Mhc e em tratamento com doxorubicina (30 mg/m<sup>2</sup>, IV, q 21 dias), dacarbazina (200 mg/ m<sup>2</sup>, IV, diariamente por 4 dias) e vincristina (0.5 mg/ m<sup>2</sup>, IV, nas semanas 3 e 4 do protocolo quimioterápico).

À necropsia, nenhum sinal específico para hemoplasmoses foi encontrado. Os únicos achados são sangue diluído, mucosas pálidas e medula óssea gelatinosa (HARVEY, 2006).

O período pré-patente para a manifestação da doença varia de 1 a 2 dias até 2 semanas após injeção intravenosa de sangue contaminado por Mhc, em cães esplenectomizados, com a anemia desenvolvendo-se de maneira aguda, levando à morte em 1 mês. Em outros cães a anemia foi gradativa. Níveis mínimos de hematócrito e hemoglobina chegou ao máximo de declínio em até 2 meses pós-infecção, e retornaram ao normal dentro do mesmo período (HARVEY, 2006). Animais naturalmente infectados podem apresentar a doença em até 4 a 9 semanas (BRINSON & MESSICK, 2001).

## 7. DIAGNÓSTICO

O diagnóstico da micoplasmose pode ser feito pela visualização direta do micoplasma na superfície da membrana do eritrócito ao exame do esfregaço sangüíneo, com o auxílio da microscopia óptica (TASKER, 2006). A observação depende do grau de bacteremia, e do tempo de confecção da lâmina, pois o anticoagulante EDTA (ácido etileno-diamino-tetraacético) faz com que os micoplasmas se desprendam da superfície do eritrócito (MESSICK, 2004). A visualização do micoplasma sobre o eritrócito não permite a identificação da espécie. Métodos sorológicos já foram descritos como o teste de imunofluorescência indireta (IFI), porém há reação cruzada com *Rickettsia conori* (KEMMING *et al.*, 2004a).

A Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) identifica a presença do DNA bacteriano no sangue (SYKES, 2005). A PCR é mais sensível que a citologia para detecção dos hemoplasmas (WESTFALL *et al.*, 2001). O diagnóstico pela PCR é

baseado na amplificação do gene 16SrRNA. Como Mhc e Mhf possuem grande homologia na seqüência de pares de base no gene 16SrRNA (99.3% a 99.7%), é necessária a amplificação de outro gene, o rnpB, que contém menor homologia de pares de base (bp), permitindo identificação da espécie (PETERS *et al.*, 2008). O sequenciamento do rnpB mostrou homologia de 94,3% a 95,5%, indicando serem duas espécies distintas (BIRKENHEUER *et al.*, 2002). SYKES *et al.*, (2008a) mostrou que é possível a utilização de sangue de esfregaços sanguíneos para o diagnóstico de hemoplasmoses em felinos, embora haja diminuição da sensibilidade nos resultados para “*Candidatus Mycoplasma haemominutum*” e para “*Candidatus Mycoplasma turicensis*” quando comparado ao PCR em tempo real que utiliza amostras de sangue total. Porém, esta técnica ainda não foi comprovada em cães.

## 8. PREVALÊNCIA

Apesar de haver muitos relatos de caso, há poucos estudos sobre a prevalência de micoplasmas hemotrópicos em cães. Na França foram analisadas 460 amostras de sangue de cães anêmicos e não anêmicos. Setenta e um (15.4%) foram positivos para micoplasmas hemotrópicos após análise pela técnica de PCR em Tempo Real. 44 (9,6%) amostras foram positivas para “*Candidatus Mycoplasma haematoparvum*”, 15 (3.3%) positivos para *Mycoplasma haemocanis* e 12 (2.6%) positivos para as 2 espécies de hemoplasmas (KENNY *et al.*, 2004). Na Suíça, de 889 amostras sanguíneas de cães analisadas pelo PCR em tempo real, 11 (1,2%) foram positivas ao PCR, com 8 (0,9%) positivas para Mhc e 3 (0,3%) para CMhp (WENGL *et al.*, 2008). INOKUMA *et al.* (2006) encontrou em cães no Sudão 25/78 (32,05%) de cães infectados com hemoplasmas, 18/78 (23,08%) para Mhc, 5/78 (6,41%) para CMhp e 2/78 (2,56%) para co-infecção pelos 2 hemoplasmas. KEMMING *et al.*, (2004b) encontraram a infecção em 3 canis comerciais na Europa e Estados Unidos, com 30%, 35% e 87% de cães infectados.

## 9. TRATAMENTO

Em cães o tratamento é realizado com oxitetraciclina na dose de 20-40mg/Kg/dia (KEMMING *et al.*, 2004a) ou doxiciclina 5-10mg/kg/dia (BRINSON & MESSICK, 2001). Em gatos, o uso de marbofloxacin (2,75 mg / kg / dia / 14 dias PO) mostrou rápida resposta contra Mhf, reduzindo a bacteremia e permitindo regeneração medular mais rápida (ISHAK *et al.*, 2008). Enrofloxacin, 5 mg/kg/dia PO por 2 semanas também é recomendado para gatos (TASKER, 2006). Todos os tratamentos não garantem a eliminação completa da infecção, podendo os animais tornarem-se reservatórios e com tratamento por toda a vida a base de corticóides, por conta da anemia imunomediada causada pela infecção (WILLI *et al.*, 2007a). WESTFALL *et al.*, (2001) identificou que azitromicina não surtiu efeito no tratamento à hemoplasmose felina. A transfusão sanguínea deve ser utilizada nos casos de anemia grave em que seu uso é indispensável para a sobrevivência do paciente.

## 10. CONCLUSÕES

A hemoplasmose em cães é uma doença silenciosa, que não mostra sinais de que está presente até que seja desencadeada por fatores de risco, podendo piorar o quadro clínico de um paciente crítico, levando-o a morte ou a tratamento que pode durar a vida toda. Conhecer o modo de transmissão e fatores de risco podem ajudar a diminuir a infecção de novos animais. Mais estudos são necessários e estão sendo realizados para se entender seu ciclo de vida e potencial como zoonose.

## 11. REFERÊNCIAS

BASEMAN, J.B.; BANAI, M.; KAHANE, I. Sialic Acid Residues Mediate *Mycoplasma pneumoniae* Attachment to Human and Sheep Erythrocytes. **Infection and Immunity**, p.389-391, 1982.

BENJAMIN, M.M.; LUMB, W.V. *Haemobartonella canis* infection in a dog. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v.135,p.388-390, 1959.

BIRKENHEUER, A. J. BREITSCHWERDT, E.B.; ALLEMAN, A.R.; PITULLE, C. Differentiation of *Haemobartonella canis* and *Mycoplasma haemofelis* on the basis of comparative analysis of gene sequences. **American Journal of Veterinary Research**, v.63, n.10, p.1385-1388, 2002.

BRINSON, J.J.; MESSICK, J.B. Use of polymerase chain reaction assay for detection of *Haemobartonella canis* in a dog. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v.218, n.12, p. 1943-1945, 2001.

BUNDZA, A.; LUMSDEN, J.H.; McSHERRY, B.J.; VALLI, V.E.O.; JANZEN, E.A. Haemobartonellosis in a dog in association with coomb's positive anemia. **The Canadian Veterinary Journal**, v.17; n.10; p.267-270, 1976.

CHALKER, V. J. Canine mycoplasmas. **Research in Veterinary Science**. v.79, p. 01-08, 2005.

GRETILLAT, S. Haemobartonellosis canis (Kikueth, 1928) in the blood of dogs with parvovirus disease. **Journal of Small Animal Practice**, v.22; p. 647-653, 1981.

GROEBEL, K.; HOELZLE, K.; WITTENBRINK, M.M.; ZIEGLER, U.; HOELZLE, J.E. Unraveling a paradigm: *Mycoplasma suis* invades porcine erythrocytes. **Infection and Immunity**, v.77, n.2, p.576-584, 2009.

HANDCOCK, W.J. Clinical haemobartonellosis associated with use of corticosteroid. **The Veterinary Record**, v.125, p.585, 1989.

HARVEY, J.W. Hemotropic Mycoplasmosis (Hemobartonellosis). In: GREENE, C.E.; **Infectious Diseases of the Dog and Cat**. 3th ed; Saunders Elsevier; cap. 31, p.252-260, 2006.

HOELZLE, L.E.; ADALT, D.; HOELZLE, K.; HEINRITZI, K.; WITTENBRINK, M.M. Development of a diagnostic PCR assay based on novel DNA sequences for the detection of *Mycoplasma suis* (*Eperythrozoon suis*) in porcine blood. **Veterinary Microbiology**, v.93, p.185-196, 2003.

HOSKINS, J.D. Canine haemobartonellosis, Canine hepatozoonosis, and Feline cytauxzoonosis. **The Veterinary Clinics of North America. Small Animal Practice**, v.21; p.129-140, 1991.

INOKUMA, H.; OYAMADA, M.; DAVOUST, B.; BONI, M.; DEREURE, J.; BUCHETON, B.; HAMMD, A.; WATANABE, M.; ITAMOTO, K.; OKUDA, M.; BROUQUI, P. Epidemiological Survey of *Ehrlichia canis* and Related Species Infection in dogs in Eastern Sudan. **Annals of the New York Academy of Sciences**, 1078, p.461-463, 2006.

ISHAK, A.;M.; DOWERS, K.L.; CAVANAUGH, M.T.; POWELL, C.C.; HAWLEY, J.R.; RADECKI, S.V.; LAPPIN, M.R. Marbofloxacin for the treatment of Experimentally induced *Mycoplasma haemofelis* infection in cats. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v.22;p. 288-292, 2008.

KEMMING, G.; MESSICK, J.B.; MUELLER, W.; ENDERS, G.; MEISNER, F.; MUENZING, S.; KISCH-WEDEL, H.; SCHROPP, A.; WOJTCZYK, C.; PACKERT, K.; MESSNER, K.; THEIN, E. Can We Continue Research in Splenectomized Dogs? *Mycoplasma haemocanis*: Old Problem – New Insight. **European Surgical Research**, v.6, p. 198-205, 2004a.

KEMMING, G.I.; MESSICK, J.B.; ENDERS, G.; BOROS, M.; LORENS, B.; MUENZING, S.; KISCH-WEDEL, H.; MUELLER, W.; HAHMANN-MUELLER, A.; MESSNER, K.; THEIN, E. *Mycoplasma haemocanis* Infecion – A Kennel Disease? **Comparative Medicine**, v.54, n.4, p.404-409, 2004b.

KENNY, M.J.; SHAW, S.E.; BEUGNET, F.; TASKER, S. Demonstration of two distinct hemotropic micoplasmas in French dogs. **Journal of Clinical Microbiology**. Vol.42, n.11, p. 5397-5399, 2004.

KIKUTH, W. liber einen neuen Anamieerreger *Barfonella canis* nov. spec. **Klin. Wochenschr.** v.37,n.7, p. 1729-1730, 1928.

LESTER, S.J.; HUME, J.B.; PHIPPS, B. *Haemobartonella canis* infection following splenectomy and transfusion. **The Canadian Veterinary Journal**, v.36; p.444-445, 1995.

LUMB, W.V. More information on haemobartonellosis in dogs. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v.219; p. 732-733, 2001.

MESSICK, J. B. "*Candidatus* Mycoplasma haemodidelphidis" sp. nov., "*Candidatus* Mycoplasma haemolamae" sp. nov., and *Mycoplasma haemocanis* comb. nov., hemotrophic parasites from a naturally infected opossum (*Didelphis virginiana*), alpaca (*Lama pacos*) and dog (*Canis familiaris*): phylogenetic and secondary structural relatedness of their 16S rRNA genes to other mycoplasmas. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v.52, p. 693-698, 2002.

MESSICK, J. B. New perspectives about Hemotrophic mycoplasma (formerly, *Haemobartonella* and *Eperythrozoon* species) infections in dogs and cats. **The Veterinary Clinics Small Animal Practice**, v.33, p. 1453-1465, 2003.

MESSICK, J. B. Hemotropic mycoplasmas (hemoplasmas): a review and new insight into pathogenic potential. **Veterinary Clinical Pathology**, v.33, n.1, p. 2-13, 2004.

MORAIS, H.S.A.; DAGNONE, A.S.; TRAPP, S.M.; VIDOTTO, O.; MESSICK, J.B. *Mycoplasma haemocanis* (Previously *Haemobartonella canis*) in non-esplenectomized dogs in Brazil: 4 cases (1999-2001). **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v.17;p. 421, 2003.

NEIMARK, H.; JOHANSSON, K.E.; RIKIHISA, Y.; TULLY, J.G. Proposal to transfer some members of the genera *Haemobartonella* and *Eperythrozoon* to the genus *Mycoplasma* with descriptions of "*Candidatus* Mycoplasma haemofelis", "*Candidatus* Mycoplasma haemomuris", "*Candidatus* Mycoplasma haemosuis" and "*Candidatus* Mycoplasma wenyonii". **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v.51, p.891-899, 2001.

NEIMARK, H.; JOHANSSON, K.E.; RIKIHISA, Y.; TULLY, J. Revision of hemotrophic Mycoplasma species names. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**; v.52; p.683, 2002.

NEIMARK, H.; HOFF, B.; GANTER, M. *Mycoplasma ovis* comb. nov. (formerly *Eperythrozoon ovis*), an eperythrocyclic agent of haemolytic anaemia in sheep and goats. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 54, p.365-371, 2004.

NORTH, D.C. Fatal haemobartonellosis in a non-esplenectomized dog – a case report. **The Journal of Small Animal Practice**, v.19, p.769-773, 1978.

PETERS, I.R.; HELPS, C.R.; McAULIFFE, L.; NEIMARK, H.; LAPPIN, M.R.; GRUFFYDD-JONES, T.J.; DAY, M.J.; HOELZLE, L.E.; WILLI, B.; MELI, M.; HOFMANN-LEHMANN, R.; TASKER, S. Rnase P RNA Gene (rnpB) Phylogeny of Hemoplasmas and Other Mycoplasma Species. **Journal of Clinical Microbiology**, v.46, n.5, p.1873-1877, 2008.

PITCHER, D.G.; NICHOLAS, R.A.J. Mycoplasma host specificity: Fact or fiction? **The Veterinary Journal**, v.170; p.300-306, 2005.

RAZIN, S. The mycoplasmas. **Microbiological Reviews**, v.42, n.2, p.414-470, 1978.

RISTIC, M.; KREIER, P. The *Rickettsias* and *Chlamydias*. **Bergey's manual of Systematic bacteriology**, Baltimore: The Williams & Wilkins Co, 724–726; 1984.

SANTOS, A.P.; SANTOS, R.P.; BIONDO, A.W.; DORA, J.M.; GOLDANI, L.Z.; TOSTES DE OLIVEIRA S, *et al.* Hemoplasma infection in HIV-positive patient, Brazil. **Emerging Infectious Diseases**, v.14, n.12, p.1922-1924, 2008.

SENEVIRATNA, P.; WEERASINGHE, N.; ARYIADASA, S. Transmission of *Haemobartonella canis* by the dog tick *Rhipicephalus sanguineus*. **Research in Veterinary Science**, v.14; p.112-114, 1973.

SYKES, J.E.; BAILIFF, N. L.; BALL, L.M.; FOREMAN, O.; GEORGE, J.W.; FRY, M.M. Identification of a novel hemotropic mycoplasma in a splenctomized dog with hemic neoplasia. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v.224, n.12, p. 1946-1951, 2004.

SYKES, J.E.; BALL, L.M.; BAILIFF, N.L.; FRY, M.M. “*Candidatus* Mycoplasma haematoparvum”, a novel small haemotropic mycoplasma from a dog. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v.55, p. 27-30, 2005.

SYKES, J.E.; TERRY, J.C.; LINDSAY, L.L.; OWENS, S.D. Prevalences of various hemoplasma species among cats in the United States with possible hemoplasmosis. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v.232; p.372-379, 2008a.

SYKES, J.E.; OWENS, S.D.; TERRY, J.C.; LINDSAY, L.L.; PUSTERLA, N. Use of dried blood smears for detection of feline hemoplasmas using real-time polymerase chain reaction. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v.20, p.616-620, 2008b.

TAGAWA, M.; MATSUMOTO, K.; INOKUMA, H. Molecular detection of *Mycoplasma wenyonii* and “*Candidatus* Mycoplasma haemobos” in cattle in Hokkaido, Japan. **Veterinary Microbiology**, v.132, p. 177-180, 2008.

TAROURA, S.; SHIMADA, Y.; SAKATA, Y.; MIYAMA, T.; HIRAOKA, H.; WATANABE, M.; ITAMOTO, K.; OKUDA, M.; INOKUMA, H. Detection of DNA of “*Candidatus* Mycoplasma haemominutum” and *Spiroplasma* sp. in Unfed Ticks Collected from vegetation in Japan. **The Journal of Veterinary Medical Science**, v.67, n.12, p. 1277-1279, 2005.

TASKER, S. Current concepts in feline haemobartonellosis. **In Practice**, v.28, p. 136-141, 2006.

TAYLOR-ROBINSON, D.; SCHAEVERBEKE, T. Mycoplasmas in rheumatoid arthritis and other human arthritides. **Journal of Clinical Pathology**, v.49; p. 781-782, 1996.

VENABLE, J. H.; EWING, S. A. Fine-structure of *Haemobartonella canis* (*Rickettsiales* : *Bartonellaceae*) and its relation to the host erythrocyte. **The Journal of Parasitology**, v.54, p. 259-268, 1968.

WENGI, N.; WILLI, B.; BORETTI, F.S.; CATTORI, V.; RIOND, B.; MELI, M.L.; REUSCH, C.E.; LUTZ, H.; HOFMANN-LEHMANN, R. Real-time PCR-based prevalence study, infection follow-up and molecular characterization of canine hemotropic mycoplasmas. **Veterinary Microbiology**, V.126. p. 132-141, 2008.

WESTFALL, D.S.; JENSEN, W.A.; REAGAN, W.J.; RADECKI, S.V.; LAPPIN, M.R. Inoculation of two genotypes of *Haemobartonella felis* (California and Ohio variants) to induce infection in cats and the response to treatment with azithromycin. **American Journal of Veterinary Research**, v.62, n.5, p.687-691, 2001.



WILLI, B.; FILONI, C.; CATÃO-DIAS, J.L.; CATTORI, V.; MELI, M.L.; VARGAS, A.; MARTÍNEZ, F.; ROELKE, M.E.; RYSER-DEGIORGIS, M.P.; LEUTENEGGER, C.M.; LUTZ, H.; HOFMANN-LEHMANN, R. Worldwide occurrence of Feline Hemoplasma Infections in Wild Felid Species. **Journal of Clinical Microbiology**, v.45, n.4, p.1159-1166, 2007a.

### III. DETECTION OF HEMOTROPIC HEMOPLASMAS IN DOGS OF CURITIBA – PARANÁ - BRAZIL

**Objectives:** To verify whether hemotropic hemoplasmas are present in dog populations of Brazil and, if present, whether their infection is related to gender, age and presence of anemia.

**Methods:** A total of 94 blood samples were taken from anemic and non-anemic dogs of Curitiba, Southern Brazil, DNA was extracted, submitted to PCR for presence of canine GAPDH housekeeping gene to insure extraction and 16SrRNA mycoplasma gene for *Mycoplasma haemocanis* (Mhc), “*Candidatus Mycoplasma haematoparvum*” (CMhp) and “*Candidatus Mycoplasma turicensis*” (CMtc). Dogs were also compared according to their gender, age and anemic status, considered when packed cell volume (PCV) was lower than 26% and 37%. Statistical analysis was performed by specific software and results considered significant when  $p < 0.05$ .

**Results:** A total of 16 (17.0%) samples were positive for at least one mycoplasma species, including 9 (9.6%) positive samples for Mhc, 4 (4.3%) for CMhp, and 3 (3.2%) for CMtc; no co-infection was detected. Among anemic dogs, no difference was found between PCV and positive or negative samples. Among positives, 13/16 (81.2%) were anemics and only 3/16 (18.8%) presented PCV within reference range. A total of 10/46 (21.7%) male and 6/46 (12.5%) female dogs were positive, with significant difference and higher risk for males. A total of 2/18 (11.1%) dogs younger than 12 months of age and 14/76 (18.4%) older were positive, with no difference for age on the study.

**Conclusions:** Hemoplasmas are more likely to infect male dogs and cause anemia, with no risk difference on age. “*Candidatus Mycoplasma turicensis*” was first detected in dogs of Curitiba, Southern Brazil.

## INTRODUCTION

Hemotropic mycoplasmas (hemoplasmas) are pleomorphic, coccoid, ring or rod shaped gram negative bacteria, with 0.3 to 2.0  $\mu\text{m}$  of diameter, and erythrocyte parasite of wide variety of animal species causing a discrete to moderate anemia (MESSICK, 2004). Dogs are normally infected by two hemoplasmas, *Mycoplasma haemocanis* (Mhc) and “*Candidatus Mycoplasma haematoparvum*” (CMhp) (MESSICK, 2004).

Damage to red blood cells may occur intra (less common) or extravascularly (more common) (HARVEY, 2006). Splenectomy, immunosuppression and co-infection may trigger disease progression (MESSICK, 2004) since healthy dogs are rarely affected (TASKER, 2006). Animals may be infected with mycoplasmas with different host species, with no infection development, showing species-specificity of each mycoplasma (LUMB, 2001). Specificity may be altered by immunocompromising status, such as *Mycoplasmas haemofelis* in anemic HIV patients (SANTOS *et al.*, 2008b). Recently, a non-anemic dog was found to be serologically positive for *Babesia sp* and also positive for *Mycoplasma haemocanis* on PCR. Hora (2008) related a cat with non-regenerative-anemia the presence of the canine hemoplasma *Mycoplasma haemocanis*.

Hemoplasma detection in healthy dogs is often a laboratory finding, made by visualization of bacteria adhered to erythrocyte membranes. Polymerase chain reaction (PCR) is more sensitive and specific than cytology, and should be applied after GAPDH housekeeping gene amplification, to insure successful extraction (WESTFALL *et al.*, 2001; BIRKENHEUER *et al.*, 2003). Amplification of hemoplasma 16SrRNA gene by PCR may help to detect hemoplasma infection, but it is not enough to identify species due to 99.3 to 99.7% homology between canine *Mycoplasma haemocanis* (Mhc) and feline *Mycoplasma haemofelis* (Mhf). PCR amplification of rnpB gene, which has only 94.3 to 95.5% homology between

Mhc and Mhf, is sufficient to allow reliable identification of either canine or feline hemoplasma DNA, (BIRKENHEUER *et al.*, 2002).

There are still few reports on hemoplasma infection in dogs throughout the world. A prospective study was performed comparing dogs of University of Illinois, USA with 3 commercial kennels, one in USA, one in Eastern Europe and another in Western Europe (KEMMING *et al.*, 2004b). No dog at the University was positive, however positivity for Mhc in the American kennel was 7/20 (35%), in the Eastern Europe 6/20 (30%) and Western Europe 20/23 (87%).

In France, 460 dogs were tested by PCR for 16SrRNA gene, resulting in 71 (15.4%) positive animals, including 44 (9.6%) for CMhp, 15 (3.3%) for Mhc, and 12 (2.6%) with co-infection (KENNY *et al.*, 2004). In Switzerland, 889 dogs were tested, and 8 (0.9%) were positive for Mhc and 3 (0.3%) for CMhp; no co-infection was detected (WENGL *et al.*, 2008). In Sudan, a total of 25/78 (32.05%) were infected with hemoplasmas, 18/78 (23.08%) for Mhc, 5/78 (6.41%) for CMhp and 2/78 (2.56%) for co-infection (INOKUMA *et al.*, 2006).

Due to lack of studies in South America on hemoplasma infection, more specifically Brazil, the aim of the present study was to survey a dog population of Curitiba, Southern Brazil, for *Mycoplasma haemocanis*, *Mycoplasma haemofelis* and "*Candidatus Mycoplasma turicensis*". If hemoplasma infection is present, a risk factor of gender, age and occurrence of anemia will be tested.

## **MATERIAL AND METHODS**

### **Animals and Samples**

A total of 94 dogs were included in the present study, all from daily routine of the Clinilab – Veterinary Pathology Laboratory, located in Curitiba, capital of Parana State, Southern Brazil. Blood samples were drawn and taken to the clinical pathology laboratory for routine complete blood count. Data from animals included gender, age and routine laboratory exams. No one of the animals included in this

study had any treatment with anti-inflammatory and/or anti-microbial medicines or have medical story of splenectomy.

Blood samples were obtained by venopunction, placed in 2mL EDTA tubes for laboratory work in a period of three months (october, 2007 to january, 2008) and one aliquot stored at -20C for DNA extraction.

Animals were considered anemic when packed cell volume (PCV) was below 26 and 37%, (Reference for dogs at the Clinilab), for dogs younger and older than 1 year, respectively. A positive sample from an anemic cat (PCV 15%, reference between 24 – 45%) was used as positive control for PCR and cytology.

## **Hematological Analysis**

Packed cell volume was determined by capilar in micro-centrifuge of 9,000G for 5 minutes. Evaluation of cellular morphology and presence of inclusions were made on light microscopy in immersion (1,000 X). The CBC was made by CELM-530 (Compania Equipadora de Laboratórios Modernos, Barueri, São Paulo).

## **Polymerase Chain Reaction (PCR)**

DNA extraction was performed on blood at room temperature, with commercial kit following manufacturer's protocol (GFX<sup>®</sup> Genomic Blood Purification Kit, GE Healthcare, Buckinghamshire, UK). Extracted DNA was first submitted to convencional PCR for canine GAPDH housekeeping gene with forward primer GAPDH-F 5` CCT TCA TTG ACC TCA ACT ACA T 3` and reverse primer GAPDH-R 5` CCA AAG TTG TCA TGG ATG ACC 3`, to insure successful extraction. Samples were then submitted to PCR for detection of *Mycoplasma haemocanis*, "*Candidatus Mycoplasma haematoparvum*" and "*Candidatus Mycoplasma turicensis*".

GAPDH protocol consisted of 1x Green GoTaq®Flexi buffer (pH 8.5), 1.5 mM MgCl<sub>2</sub>, dNTPs at concentration of 200 µM, forward and reverse primers at 0.2 µM, 1.25 U of GoTaq®Flexi DNA polimerase, 5 µL of DNA and bi-distilled deionized water up to 25 µL final volume reaction. Mixture was taken to thermocycler on initial denaturing of 5 minutes at 94C, 30 cycles of 45 seconds at 94C, 45 seconds at 55C, 45 seconds at 72C, and a final cycle of 5 minutes at 72C (BIRKENHEUER *et al.*, 2003).

PCR for hemoplasmas were performed with primers designed for feline 16SrRNA gene, due to very high homology between *Mycoplasma haemocanis* and *Mycoplasma haemofelis*, and between “*Candidatus Mycoplasma haematoparvum*” and “*Candidatus Mycoplasma haemominutum*”, as previously described (BERENT & MESSICK, 1998; SANTOS, 2008a). For *Mycoplasma haemocanis* detection, a forward primer DEAMHF-F1 5`- ATG CAA GTC GAA CGG ATC TT – 3` and a reverse primer DEAMHF R2 5`- TCC AAT CAG AAT GTT CAC TC – 3` designed for *Mycoplasma haemofelis* were applied. For detection of “*Candidatus Mycoplasma haematoparvum*”, a forward primer DEAMHM F1 5` - ATG CAA GTC GAA CGA AGA GG – 3` and reverse primer CALI R2 previously described for “*Candidatus Mycoplasma haemominutum*” were used (FOLEY *et al.*, 1998). For detection of “*Candidatus Mycoplasma turicensis*”, a set of forward primer DEAMTC F1 5`- CTG TCC AAA AGG CAG TTA GC – 3` and reverse primer DEAMTC R1 5` - TGC CCC TTC CTC TCA TAG TTT – 3` previously designed for feline blood was used (SANTOS, 2008a).

Mixture of reagents for each reaction was performed as following: 1X Green GoTaq®Flexi Buffer (Promega, Madison, WI, USA), 2.0 mM MgCl<sub>2</sub>, dNTPs at concentration of 200 µM, 0.4 µM of each primer, 1.25 U of GoTaq®Flexi DNA polimerase, 5 µL of DNA sample, and bi-distilled deionized water up to 25 µL final volume reaction. Mixture was placed into a thermocycler (Eppendorf Scientific, Inc., Westbury, NY, USA) with initial denature cycle of 2 minutes at 94C, 35 cycles of 1 minute at 94C, 45 seconds at 53C, 90 seconds at 72C and a final cycle of 5 minutes at 72C. Amplicons were submitted to eletrophoresis in 1.5% agarose gel

for 1 hour in 80V, and stained with ethidium bromide to be visualized under ultraviolet light. Visual results were photographed by Epi Chemi II Darkroom® system (UVP Inc., Upland, CA, USA), and measurements taken based on 100bp molecular weight marker (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). Extracted DNA from Blood of naturally infected cats with Mhf, CMhm and CMtc were used as positive controls. DNA extracted from blood of cats free of infection was used for negative controls. Tests were performed in duplicate to insure consistent results.

### **Statistical Analysis**

Significance of anemia and positivity for hemoplasma PCR correlation was evaluated. Descriptive analysis and chi-square test were used to test correlation of age and gender to anemia and PCR results. Significance between PCV and anemia for at least one hemoplasma (Mhc, CMhp or CMtc) and for each hemoplasma, and differences between PCV of anemic positive dogs for hemoplasma and negative dogs was verified by ANOVA one-way. Results were considered statistically significant when  $P < 0.05$ .

## **RESULTS**

Out of 94 dogs evaluated, 64 presented PCV below reference range (anemics), 23 presented PCV within reference range and 4 were considered with polycitemia (both considered as non-anemics). No dog presented detectable erythrocyte inclusion suspicious for hemoplasmas. Analysis of positive cat revealed coccoid structures as chains on erythrocyte membranes.

All 94 samples were previously submitted to PCR for GAPDH gene amplification to insure successful extraction. When applied specific protocols for hemoplasmas, resulting amplicons presented 393 bp for Mhc, 192 bp for CMhp and 488 bp for CMtc. Negative controls produce no PCR amplification, as expected.

Out of 94 dog samples tested, 16 (17.0%) were positive for at least one hemoplasma species, with 9 (9.6%) positive for Mhc, 4 (4.3%) for CMhp and 3 (3.2%) for CMtc. No hemoplasma co-infection was detected on PCR (GRAPHIC 01). On the group of anemic dogs, 7/64 (10.9%) were positive for Mhc, 4/64 (6.3%) were positive for CMhp and 2/64 (3.1%) for CMtc. On the group of non anemic dogs, 2/30 (6.7%) were positive for Mhc, 1/30 (3.3%) for CMtc and no dog for CMhp. The cat sample was positive for CMtc and for Mhf.

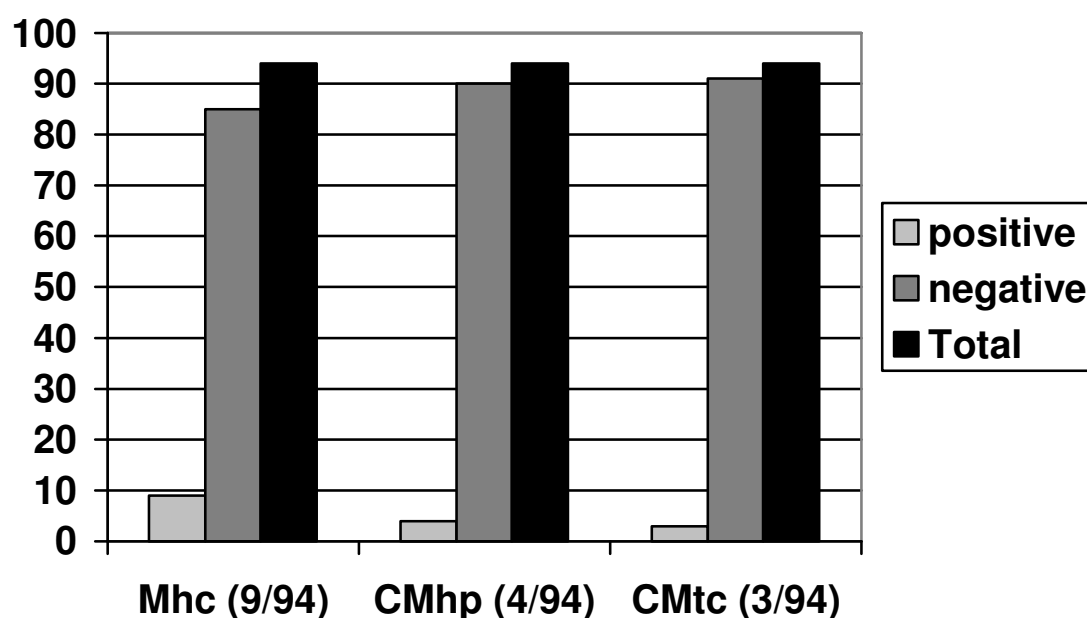


TABLE 01 – Number of PCR positive dogs for 16SrRNA gene amplification, tested for *Mycoplasma haemocanis*, “*Candidatus Mycoplasma haematoparvum*” and “*Candidatus Mycoplasmas turicensis*”.



Risk factors were analyzed, and included age, gender, presence of infection with anemia and difference of degree of anemia between positive and negative groups to the presence of hemoplasma on PCR. Qui-square and p values for each risk factor are presented on TABLE 01. Analysis of pathogenicity of each hemoplasma are presented on TABLE 02.

No significant difference was observed between PCV of positive anemic group when compared to negative anemic group for hemoplasmas ( $p=0.716$ ), Mhc ( $p=0.784$ ), CMhp (0.608) e CMtc (0.417) (TABLE 02). Descriptive analysis showed that between positives for hemoplasmas, 13/16 (81.2%) were anemics, while 3/16 (18.8%) were non anemics. Regarding to gender, between male dogs, 10/46 (21.7%) were positive, with 6/46 (13.04%) for Mhc, 2/46 (4.34%) for CMhp and 2/46 (4.34%) for CMtc. Between female dogs, 6/48 (12.5%) were positive, with 3/48 (6.2%) for Mhc, 2/48 (4.2%) for CMhp and 1/48 (2.1%) for CMtc. Out of positives, 10/16 (62.5%) were males and 6/16 (37.5%) were females. Regarding to age, among dogs younger than 12 months, 2/18 (11.1%) were positive for hemoplasma, none for Mhc, 1/18 (5.5%) for CMhp, and 1/18 (5.5%) for CMtc. Among dog older than 12 months, 14/76 (18.4%) were positive for hemoplasmas, 9/76 (11.8%) for Mhc, 3/76 (4.0%) for CMhp, and 2/76 (2,6%) for CMtc. Among infected dogs, 2/16 (12.5%) were younger than 12 months and 14/16 (87.5%) were older than 12 months of age.

## DISCUSSION

Dogs with clinical signs of hemoplasmosis have been reported (BRINSON & MESSICK, 2001; SYKES *et al.*, 2004), however all presented splenectomy and immuno-compromised status such as chemotherapy and lymphocytic neoplasia. In

this study, out of 64 anemic dogs, 13 were positive for hemoplasmas, while among the 30 non anemic only 3 were positive, showing that infection and anemia were related ( $p=0.0001$ ). No correlation between infection and anemia was found in 889 dogs surveyed, but no splenectomized dog was included, and immunological status was not evaluated (WENGI *et al.*, 2008).

Among anemic group, no significant difference was found between PCV of two groups ( $p=0.716$ ), also with no difference between negative anemics and anemics infected with Mhc ( $p=0.784$ ), CMhp ( $p=0.608$ ) e CMtc ( $p=0.417$ ). This feature showed that even if the anemia of animals may be caused by mycoplasmas, the degree of anemia is not severe, corroborating with other studies (MESSICK, 2004; HARVEY, 2006).

Frequency of infected dogs in the present study (17.0%) was similar to 15.4% frequency found by other study conducted with 460 dogs in France (KENNY *et al.*, 2004) (15,4%), but different from a study in Switzerland with 889 dogs, when a frequency of infection was much lower, only 1.2% (WENGI *et al.*, 2008), and other in Sudan with 78 dogs, when a much higher infection frequency of 32.0% para hemoplasmas was detected por PCR (INOKUMA *et al.*, 2008). Such difference may be partially explained by geographic locations where studies were conducted and the distribution of transmissors of hemoplasmas. Higher frequency of infection was detected in kennels, showing that it may be related to greater proximity of dogs, all sharing common space (KEMMING *et al.* (2003b).

Despite 11/889 dogs were positive by PCR of hemoplasmas in Switzerland, only one was on group of 22 anemic dogs. However, no comparison can be made since there is no enough data on this study for comparison (WENGI *et al.*, 2008).

*Mycoplasma haemocanis* was the most detected species in the present study, what is similar to studies conducted in Switzerland and Sudan (WENGI *et al.*, 2008; INOKUMA *et al.*, 2008), but different from a study in France, which found higher frequency of “*Candidatus Mycoplasma haematoparvum*” (KENNY *et al.*,

2004). Similar prevalences with difference on the main species found, as observed elsewhere (KENNY *et al.*, 2008) have also been reported in cats, 19.5% and 18.8% frequency for *Mycoplasma haemofelis* and “*Candidatus* *Mycoplasma haemominutum*”, respectively (JENSEY *et al.*, 2001; TASKER *et al.*, 2003b).

Qui-square analysis has shown that infection was more present among male than female dogs ( $p=0.001$ ). However, other studies with more animal sampling, surveying 460 (KENNY *et al.*, 2004) and 889 dogs (WENGL *et al.*, 2008), have found no differences between males and females. Those studies may better represent general population, and less influenced by interference and error than the present study. However, a study surveying cats in Sao Paulo has found that males are more likely to be infected with hemoplasmas than females (HORA, 2008). Higher risk was attributed to higher contact of male cats through fights and bites, since hemoplasma is present in saliva and salivary gland of cats (DEAN *et al.*, 2008). Mechanism of hemoplasma transmission has not been clarified in dogs and therefore susceptibility of infection by higher direct contact of saliva is still theoretical speculation.

Qui-square analysis has shown no differences between age and status of infection ( $p=0.999$ ), however descriptive analysis has shown that animals younger than 12 months of age are less likely to be infected than older cats. Other two studies with dogs have not found these differences (KENNY *et al.*, 2004; WENGL *et al.*, 2008), and there is no apparent explanation for these results.

Despite specificity of hemoplasmas to host species, cross infection may occur among different host species with no developing of infection (LUMB, 2001). Another study has detected *Mycoplasma haemocanis* in a cat with no regenerative anemia, showing cross infection in Brazilian cats (HORA, 2008).

## CONCLUSIONS

Presence of anemia and infection by hemoplasmas was positively related, showing that hemoplasmas may cause anemia in non splenectomized dogs. However, hemoplasma co-infection was not observed in the present study, and further studies of concomitant infection with other diseases and/or immunodeficiency should be evaluated.

Although with no apparent explanation, male dogs are more likely to have infection. No significant differences were found on age.

This is the first report of "*Candidatus Mycoplasma turicensis*" in dogs of Curitiba, Southern Brazil, which indicates that dogs may play a role as reservoirs of hemoplasmas for other species.

## REFERENCES

BERENT, L.M.; MESSICK, J.B.; COOPER, S.K. Detection of *Haemobartonella felis* in cats with experimentally induced acute and chronic infections, using a polymerase chain reaction assay. **American Journal of Veterinary Research**, v.59; p.1215-1220, 1998.

BIRKENHEUER, A. J. BREITSCHWERDT, E.B.; ALLEMAN, A.R.; PITULLE, C. Differentiation of *Haemobartonella canis* and *Mycoplasma haemofelis* on the basis of comparative analysis of gene sequences. **American Journal of Veterinary Research**, v.63, n.10, p.1385-1388, 2002.

BIRKENHEUER, A.J.; LEVY, M.G.; BREITSCHWERDT, E.B. Development and Evaluation of a Semi-nested PCR for detection and Differentiation of *Babesia gibsoni* (Asian Genotype), and *B. canis* in canine blood samples. **Journal of Clinical Microbiology**, v.41; p.4172-4177, 2003.

DEAN, R.; HELPS, C. R.; GRUFFYDD-JONES, T. J.; TASKER, S. Use of real-time PCR to detect *Mycoplasma haemofelis* and “*Candidatus* *Mycoplasma haemominutum*” in the saliva and salivary glands of haemoplasma-infected cats. In: **Proceedings of the 48th Annual British Small Animal Veterinary Association Congress**, Birmingham, UK. April 7 to 10, p 554, 2008.

FOLEY, J.E.; HARRUS, S.; POLAND, A.; CHOMEL, B.; PEDERSEN, N.C. Molecular, clinical, and pathologic comparison of two distinct strains of *Haemobartonella felis* in domestic cats. **American Journal of Veterinary Research**, v.59, n.12, p.1581-1588, 1998.

HARVEY, J.W. Hemotrophic Mycoplasmosis (Hemobartonellosis). In: GREENE, C.E.; **Infectious Diseases of the Dog and Cat**. 3th ed; Saunders Elsevier; cap. 31, p.252-260, 2006.

HORA, A.S. **Micoplasmas hemotrópicos como potenciais agentes causadores de anemia em felinos domésticos**. 2008. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias) – Programa de Pós-Graduação em Clínica Veterinária da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo.

INOKUMA, H.; OYAMADA, M.; DAVOUST, B.; BONI, M.; DEREURE, J.; BUCHETON, B.; HAMMD, A.; WATANABE, M.; ITAMOTO, K.; OKUDA, M.; BROUQUI, P. Epidemiological Survey of *Ehrlichia canis* and Related Species Infection in dogs in Eastern Sudan. **Annals of the New York Academy of Sciences**, 1078, p.461-463, 2006.

JENSEN, W.A.; LAPPIN, M.R.; KAMKAR, S.; REAGAN, W.J. Use of a Polymerase Chain Reaction assay to detect and differentiate two strains of *Haemobartonella felis* in naturally infected cats. **American Journal of Veterinary Research**, v.62, p.604-608, 2001.

KEMMING, G.I.; MESSICK, J.B.; ENDERS, G.; BOROS, M.; LORENS, B.; MUENZING, S.; KISCH-WEDEL, H.; MUELLER, W.; HAHMANN-MUELLER, A.; MESSNER, K.; THEIN, E. *Mycoplasma haemocanis* Infecção – A Kennel Disease? **Comparative Medicine**, v.54, n.4, p.404-409, 2004b.

KENNY, M.J.; SHAW, S.E.; BEUGNET, F.; TASKER, S. Demonstration of two distinct hemotropic micoplasmas in French dogs. **Journal of Clinical Microbiology**. Vol.42, n.11, p. 5397-5399, 2004.

LUMB, W.V. More information on haemobartonellosis in dogs. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v.219; p. 732-733, 2001.

MESSICK, J. B. Hemotropic mycoplasmas (hemoplasmas): a review and new insight into pathogenic potential. **Veterinary Clinical Pathology**, v.33, n.1, p. 2-13, 2004.

MORAIS, H.S.A.; DAGNONE, A.S.; TRAPP, S.M.; VIDOTTO, O.; MESSICK, J.B. *Mycoplasma haemocanis* (Previously *Haemobartonella canis*) in non-splenectomized dogs in Brazil: 4 cases (1999-2001). **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v.17;p. 421, 2003.

SANTOS, A.P. **Infecção por Hemoplasmas em Felinos Domésticos na região de Porto Alegre, RS, Brasil**. 2008a, Tese (Doutorado em Ciências Veterinárias) – Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias. Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

SANTOS, A.P.; SANTOS, R.P.; BIONDO, A.W.; DORA, J.M.; GOLDANI, L.Z.; TOSTES DE OLIVEIRA, S.T.; GUIMARÃES, A.M.S.; TIMENETSKY, J.; MORAIS,

H.A.; GONZÁLEZ, F.H.D.; MESSICK, J. Hemoplasma infection in HIV-positive patient, Brazil. **Emerging Infectious Diseases**, v.14, n.12, p.1922-1924, 2008b.

SYKES, J.E.; BAILIFF, N. L.; BALL, L.M.; FOREMAN, O.; GEORGE, J.W.; FRY, M.M. Identification of a novel hemotropic mycoplasma in a splenctomized dog with hemic neoplasia. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v.224, n.12, p. 1946-1951, 2004.

TASKER, S.; BINNS, S.H.; DAY, M.J.; GRUFFYDD-JONES, T.J.; HARBOUR, D.A.; HELPS, C.R.; JENSEN, W.A.; OLVER, C.S.; LAPPIN, M.R. Use of a PCR assay to assess the prevalence and risk factors for *Mycoplasma haemofelis* and “*Candidatus Mycoplasma haemominutum*” in cats in the United Kingdom. **Veterinary Record**, v.152, p.193-198, 2003b.

TASKER, S. Current concepts in feline haemobartonellosis. **In Practice**, v.28, p. 136-141, 2006.

WENGI, N.; WILLI, B.; BORETTI, F.S.; CATTORI, V.; RIOND, B.; MELI, M.L.; REUSCH, C.E.; LUTZ, H.; HOFMANN-LEHMANN, R. Real-time PCR-based prevalence study, infection follow-up and molecular characterization of canine hemotropic mycoplasmas. **Veterinary Microbiology**, V.126. p. 132-141, 2008.

WESTFALL, D.S.; JENSEN, W.A.; REAGAN, W.J.; RADECKI, S.V.; LAPPIN, M.R. Inoculation of two genotypes of *Haemobartonella felis* (California and Ohio variants) to induce infection in cats and the response to treatment with azithromycin. **American Journal of Veterinary Research**, v.62, n.5, p.687-691, 2001.

## IV. CONCLUSÕES FINAIS

Este trabalho indicou pela primeira vez a presença de hemoplasmas em cães na cidade de Curitiba.

A presença das bactérias no sangue dos cães está relacionada e anemia, porém não foi detectada diferença entre hematócrito de cães anêmicos positivos e anêmicos negativos.

Verificou-se que animais do sexo masculino têm maiores chances de apresentarem-se infectados que animais do sexo feminino.

A presença de “*Candidatus Mycoplasma turicensis*” no sangue de cães com anemia, além de ser o primeiro relato desta espécie em cães no Brasil, podem indicar que cães também desenvolvem a infecção. No entanto as causas das anemias apresentadas neste estudo não foram avaliadas e, portanto mais estudos são necessários para se confirmar a patogenicidade dos hemoplasmas felinos para cães. Esta infecção interespecies deve ser melhor estudadas, como no caso do paciente HIV-positivo, anêmico, com infecção para *Mycoplasma haemofelis*.

O potencial zoonótico destes hemoplasmas deve ser avaliado, principalmente em pacientes com imunossupressão, tanto animais como seres humanos, como causa de anemias aparentemente sem causas.



## V. REFERÊNCIAS

BASEMAN, J.B.; BANAI, M.; KAHANE, I. Sialic Acid Residues Mediate *Mycoplasma pneumoniae* Attachment to Human and Sheep Erythrocytes. **Infection and Immunity**, p.389-391, 1982.

BENJAMIN, M.M.; LUMB, W.V. *Haemobartonella canis* infection in a dog. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v.135,p.388-390, 1959.

BERENT, L.M.; MESSICK, J.B.; COOPER, S.K. Detection of *Haemobartonella felis* in cats with experimentally induced acute and chronic infections, using a polymerase chain reaction assay. **American Journal of Veterinary Research**, v.59; p.1215-1220, 1998.

BIRKENHEUER, A. J. BREITSCHWERDT, E.B.; ALLEMAN, A.R.; PITULLE, C. Differentiation of *Haemobartonella canis* and *Mycoplasma haemofelis* on the basis of comparative analysis of gene sequences. **American Journal of Veterinary Research**, v.63, n.10, p.1385-1388, 2002.

BIRKENHEUER, A.J.; LEVY, M.G.; BREITSCHWERDT, E.B. Development and Evaluation of a Seminested PCR for detection and Differentiation of *Babesia gibsoni* (Asian Genotype), and *B. canis* in canine blood samples. **Journal of Clinical Microbiology**, v.41; p.4172-4177, 2003.

BRINSON, J.J.; MESSICK, J.B. Use of polymerase chain reaction assay for detection of *Haemobartonella canis* in a dog. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v.218, n.12, p. 1943-1945, 2001.

BUNDZA, A.; LUMSDEN, J.H.; McSHERRY, B.J.; VALLI, V.E.O.; JANZEN, E.A. Haemobartonellosis in a dog in association with coomb's positive anemia. **The Canadian Veterinary Journal**, v.17; n.10; p.267-270, 1976.

CHALKER, V. J. Canine mycoplasmas. **Research in Veterinary Science**. v.79, p. 01-08, 2005.

DEAN, R.; HELPS, C. R.; GRUFFYDD-JONES, T. J.; TASKER, S. Use of real-time PCR to detect *Mycoplasma haemofelis* and “*Candidatus Mycoplasma haemominutum*” in the saliva and salivary glands of haemoplasma-infected cats. In: **Proceedings of the 48th Annual British Small Animal Veterinary Association Congress**, Birmingham, UK. April 7 to 10, p 554, 2008.

FOLEY, J.E.; HARRUS, S.; POLAND, A.; CHOMEL, B.; PEDERSEN, N.C. Molecular, clinical, and pathologic comparison of two distinct strains of *Haemobartonella felis* in domestic cats. **American Journal for Veterinary Research**, v.59, n.12, p.1581-1588, 1998.

GRETILLAT, S. Haemobartonellosis canis (Kikuth, 1928) in the blood of dogs with parvovirus disease. **Journal of Small Animal Practice**, v.22; p. 647-653, 1981.

GROEBEL, K.; HOELZLE, K.; WITTENBRINK, M.M.; ZIEGLER, U.; HOELZLE, J.E. Unraveling a paradigm: *Mycoplasma suis* invades porcine erythrocytes. **Infection and Immunity**, v.77, n.2, p.576-584, 2009.

HANDCOCK, W.J. Clinical haemobartonellosis associated with use of corticosteroid. **The Veterinary Record**, v.125, p.585, 1989.

HARVEY, J.W. Hemotropic Mycoplasmosis (Hemobartonellosis). In: GREENE, C.E.; **Infectious Diseases of the Dog and Cat**. 3th ed; Saunders Elsevier; cap. 31, p.252-260, 2006.

HOELZLE, L.E.; ADALT, D.; HOELZLE, K.; HEINRITZI, K.; WITTENBRINK, M.M. Development of a diagnostic PCR assay based on novel DNA sequences for the detection of *Mycoplasma suis* (*Eperythrozoon suis*) in porcine blood. **Veterinary Microbiology**, v.93, p.185-196, 2003.

HOSKINS, J.D. Canine haemobartonellosis, Canine hepatozoonosis, and Feline cytauxzoonosis. **The Veterinary Clinics of North America. Small Animal Practice**, v.21; p.129-140, 1991.

HORA, A.S. **Micoplasmas hemotrópicos como potenciais agentes causadores de anemia em felinos domésticos**. 2008. Dissertação (Mestrado em Ciências

Veterinárias) – Programa de Pós-Graduação em Clínica Veterinária da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo.

INOKUMA, H.; OYAMADA, M.; DAVOUST, B.; BONI, M.; DEREURE, J.; BUCHETON, B.; HAMMD, A.; WATANABE, M.; ITAMOTO, K.; OKUDA, M.; BROUQUI, P. Epidemiological Survey of *Ehrlichia canis* and Related Species Infection in dogs in Eastern Sudan. **Annals of the New York Academy of Sciences**, 1078, p.461-463, 2006.

ISHAK, A.;M.; DOWERS, K.L.; CAVANAUGH, M.T.; POWELL, C.C.; HAWLEY, J.R.; RADECKI, S.V.; LAPPIN, M.R. Marbofloxacin for the treatment of Experimentally induced *Mycoplasma haemofelis* infection in cats. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v.22;p. 288-292, 2008.

JENSEN, W.A.; LAPPIN, M.R.; KAMKAR, S.; REAGAN, W.J. Use of a Polymerase Chain Reaction assay to detect and differentiate two strains of *Haemobartonella felis* in naturally infected cats. **American Journal of Veterinary Research**, v.62, p.604-608, 2001.

KEMMING, G.; MESSICK, J.B.; MUELLER, W.; ENDERS, G.; MEISNER, F.; MUENZING, S.; KISCH-WEDEL, H.; SCHROPP, A.; WOJTCZYK, C.; PACKERT, K.; MESSNER, K.; THEIN, E. Can We Continue Research in Splenectomized Dogs? *Mycoplasma haemocanis*: Old Problem – New Insight. **European Surgical Research**, v.6, p. 198-205, 2004a.

KEMMING, G.I.; MESSICK, J.B.; ENDERS, G.; BOROS, M.; LORENS, B.; MUENZING, S.; KISCH-WEDEL, H.; MUELLER, W.; HAHMANN-MUELLER, A.; MESSNER, K.; THEIN, E. *Mycoplasma haemocanis* Infecion – A Kennel Disease? **Comparative Medicine**, v.54, n.4, p.404-409, 2004b.

KENNY, M.J.; SHAW, S.E.; BEUGNET, F.; TASKER, S. Demonstration of two distinct hemotropic micoplasmas in French dogs. **Journal of Clinical Microbiology**. Vol.42, n.11, p. 5397-5399, 2004.

KIKUTH, W. liber einen neuen Anamieerreger *Barfonella canis* nov. spec. **Klin. Wochenschr.** v.37,n.7, p. 1729-1730, 1928.

LESTER, S.J.; HUME, J.B.; PHIPPS, B. *Haemobartonella canis* infection following splenectomy and transfusion. **The Canadian Veterinary Journal**, v.36; p.444-445, 1995.

LUMB, W.V. More information on haemobartonellosis in dogs. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v.219; p. 732-733, 2001.

MESSICK, J. B. "*Candidatus* Mycoplasma haemodidelphidis" sp. nov., "*Candidatus* Mycoplasma haemolamae" sp. nov., and *Mycoplasma haemocanis* comb. nov., hemotrophic parasites from a naturally infected opossum (*Didelphis virginiana*), alpaca (*Lama pacos*) and dog (*Canis familiaris*): phylogenetic and secondary structural relatedness of their 16S rRNA genes to other mycoplasmas. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v.52, p. 693-698, 2002.

MESSICK, J. B. New perspectives about Hemotrophic mycoplasma (formerly, *Haemobartonella* and *Eperythrozoon* species) infections in dogs and cats. **The Veterinary Clinics Small Animal Practice**, v.33, p. 1453-1465, 2003.

MESSICK, J. B. Hemotropic mycoplasmas (hemoplasmas): a review and new insight into pathogenic potencial. **Veterinary Clinical Pathology**, v.33, n.1, p. 2-13, 2004.

MORAIS, H.S.A.; DAGNONE, A.S.; TRAPP, S.M.; VIDOTTO, O.; MESSICK, J.B. *Mycoplasma haemocanis* (Previously *Haemobartonella canis*) in non-esplenectomized dogs in Brazil: 4 cases (1999-2001). **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v.17;p. 421, 2003.

NEIMARK, H.; JOHANSSON, K.E.; RIKIHISA, Y.; TULLY, J.G. Proposal to transfer some members of the genera *Haemobartonella* and *Eperythrozoon* to the genus *Mycoplasma* with descriptions of "*Candidatus* Mycoplasma haemofelis", "*Candidatus* Mycoplasma haemomuris", "*Candidatus* Mycoplasma haemosuis" and "*Candidatus* Mycoplasma wenyonii". **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v.51, p.891-899, 2001.

NEIMARK, H.; JOHANSSON, K.E.; RIKIHISA, Y.; TULLY, J. Revision of hemotrophic *Mycoplasma* species names. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**; v.52; p.683, 2002.

NEIMARK, H.; HOFF, B.; GANTER, M. *Mycoplasma ovis* comb. nov. (formerly *Eperythrozoon ovis*), an epierythrocytic agent of haemolytic anaemia in sheep and goats. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 54, p.365-371, 2004.

NORTH, D.C. Fatal haemobartonellosis in a non-esplenectomized dog – a case report. **The Journal of Small Animal Practice**, v.19, p.769-773, 1978.

PETERS, I.R.; HELPS, C.R.; McAULIFFE, L.; NEIMARK, H.; LAPPIN, M.R.; GRUFFYDD-JONES, T.J.; DAY, M.J.; HOELZLE, L.E.; WILLI, B.; MELI, M.; HOFMANN-LEHMANN, R.; TASKER, S. Rnase P RNA Gene (rnpB) Phylogeny of Hemoplasmas and Other Mycoplasma Species. **Journal of Clinical Microbiology**, v.46, n.5, p.1873-1877, 2008.

PITCHER, D.G.; NICHOLAS, R.A.J. Mycoplasma host specificity: Fact or fiction? **The Veterinary Journal**, v.170; p.300-306, 2005.

RAZIN, S. The mycoplasmas. **Microbiological Reviews**, v.42, n.2, p.414-470, 1978.

RISTIC, M.; KREIER, P. The *Rickettsias* and *Chlamydias*. **Bergey's manual of Systematic bacteriology**, Baltimore: The Williams & Wilkins Co,724–726; 1984.

SANTOS, A.P. **Infecção por Hemoplasmas em Felinos Domésticos na região de Porto Alegre, RS, Brasil**. 2008a, Tese (Doutorado em Ciências Veterinárias) – Programa ed Pós-Graduação em Ciências Veterinárias. Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

SANTOS, A.P.; SANTOS, R.P.; BIONDO, A.W.; DORA, J.M.; GOLDANI, L.Z.; TOSTES DE OLIVEIRA, S.T.; GUIMARÃES, A.M.S.; TIMENETSKY, J.; MORAIS, H.A.; GONZÁLEZ, F.H.D.; MESSICK, J. Hemoplasma infection in HIV-positive patient, Brazil. **Emerging Infectious Diseases**, v.14, n.12, p.1922-1924, 2008b.

SENEVIRATNA, P.; WEERASINGHE, N.; ARYIADASA, S. Transmission of *Haemobartonella canis* by the dog tick *Rhipicephalus sanguineus*. **Research in Veterinary Science**, v.14; p.112-114, 1973.

SYKES, J.E.; BAILIFF, N. L.; BALL, L.M.; FOREMAN, O.; GEORGE, J.W.; FRY, M.M. Identification of a novel hemotropic mycoplasma in a splenctomized dog with hemic neoplasia. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v.224, n.12, p. 1946-1951, 2004.

SYKES, J.E.; BALL, L.M.; BAILIFF, N.L.; FRY, M.M. "*Candidatus* Mycoplasma haematoparvum", a novel small haemotropic mycoplasma from a dog. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v.55, p. 27-30, 2005.

SYKES, J.E.; TERRY, J.C.; LINDSAY, L.L.; OWENS, S.D. Prevalences of various hemoplasma species among cats in the United States with possible hemoplasmosis. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v.232; p.372-379, 2008a.

SYKES, J.E.; OWENS, S.D.; TERRY, J.C.; LINDSAY, L.L.; PUSTERLA, N. Use of dried blood smears for detection of feline hemoplasmas using real-time polymerase chain reaction. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v.20, p.616-620, 2008b.

TAGAWA, M.; MATSUMOTO, K.; INOKUMA, H. Molecular detection of *Mycoplasma wenyonii* and "*Candidatus* Mycoplasma haemobos" in cattle in Hokkaido, Japan. **Veterinary Microbiology**, v.132, p. 177-180, 2008.

TAROURA, S.; SHIMADA, Y.; SAKATA, Y.; MIYAMA, T.; HIRAOKA, H.; WATANABE, M.; ITAMOTO, K.; OKUDA, M.; INOKUMA, H. Detection of DNA of "*Candidatus* Mycoplasma haemominutum" and *Spiroplasma* sp. in Unfed Ticks Collected from vegetation in Japan. **The Journal of Veterinary Medical Science**, v.67, n.12, p. 1277-1279, 2005.

TASKER, S.; BINNS, S.H.; DAY, M.J.; GRUFFYDD-JONES, T.J.; HARBOUR, D.A.; HELPS, C.R.; JENSEN, W.A.; OLVER, C.S.; LAPPIN, M.R. Use of a PCR assay to assess the prevalence and risk factors for *Mycoplasma haemofelis* and "*Candidatus* Mycoplasma haemominutum" in cats in the United Kingdom. **Veterinary Record**, v.152, p.193-198, 2003.

TASKER, S. Current concepts in feline haemobartonellosis. **In Practice**, v.28, p. 136-141, 2006.

TAYLOR-ROBINSON, D.; SCHAEVERBEKE, T. Mycoplasmas in rheumatoid arthritis and other human arthritides. **Journal of Clinical Pathology**, v.49; p. 781-782, 1996.

VENABLE, J. H.; EWING, S. A. Fine-structure of *Haemobartonella canis* (*Rickettsiales* : *Bartonellaceae*) and its relation to the host erythrocyte. **The Journal of Parasitology**, v.54, p. 259-268, 1968.

WENGI, N.; WILLI, B.; BORETTI, F.S.; CATTORI, V.; RIOND, B.; MELI, M.L.; REUSCH, C.E.; LUTZ, H.; HOFMANN-LEHMANN, R. Real-time PCR-based prevalence study, infection follow-up and molecular characterization of canine hemotropic mycoplasmas. **Veterinary Microbiology**, V.126. p. 132-141, 2008.

WESTFALL, D.S.; JENSEN, W.A.; REAGAN, W.J.; RADECKI, S.V.; LAPPIN, M.R. Inoculation of two genotypes of *Haemobartonella felis* (California and Ohio variants) to induce infection in cats and the response to treatment with azithromycin. **American Journal of Veterinary Research**, v.62, n.5, p.687-691, 2001.

WILLI, B.; FILONI, C.; CATÃO-DIAS, J.L.; CATTORI, V.; MELI, M.L.; VARGAS, A.; MARTÍNEZ, F.; ROELKE, M.E.; RYSER-DEGIORGIS, M.P.; LEUTENEGGER, C.M.; LUTZ, H.; HOFMANN-LEHMANN, R. Worldwide occurrence of Feline Hemoplasma Infections in Wild Felid Species. **Journal of Clinical Microbiology**, v.45, n.4, p.1159-1166, 2007a.

## VI. ANEXOS

**TABELA 01** – Quantidade de animais positivos e negativos, divididos por grupo de sexo, presença de anemia, idade e valores de qui-quadrado e p, em 94 cães da cidade de Curitiba.

População	SEXO		ANEMIA		IDADE	
	Macho	Fêmea	Presente	Ausente	<12 meses	>12 meses
Positivo	10	6	13	3	2	14
Negativo	36	42	51	27	16	62
% positivo	62.5	37.5	81.2	18.8	12.5	87.5
X <sup>2</sup>	1,42		1,54		0,55	
P	0,001282		0,000123		0,999	

X<sup>2</sup> = Qui-quadrado

**TABELA 02** – Hematócrito mínimo, máximo, médio e desvio padrão (dp) de 64 cães anêmicos positivos e negativos à presença de hemoplasmas, *Mycoplasma haemocanis* (Mhc), “*Candidatus Mycoplasma haematoparvum*” (CMhp) e “*Candidatus Mycoplasma turicensis*” (CMtc) pela técnica de reação em cadeia da polimerase (PCR) para o gene 16SrRNA, da cidade de Curitiba.

POPULAÇÃO (n)	Ht mínimo	Ht máximo	Médio	DP	P
Anêmicos – (51)	11	36	24,647	7,014	
Anêmicos + (13)	12	35	23,85	7,28	0,716
Anêmicos + Mhc (7)	14	35	25,43	7,368	0,784
Anêmicos + CMhp (4)	12	31	22,75	8,261	0,608
Anêmicos + CMtc (2)	15	26	20,50	7,778	0,417

Ht – Hematócrito

+ positivos a PCR para o gene 16SrRNA para hemoplasma

- negativos a PCR para o gene 16SrRNA para hemoplasma



**TABELA 03** – Valores mínimos, máximos, media e desvio padrão dos hematócritos, em porcentagem, de cães da cidade de Curitiba analisados para presença do gene GAPDH, dos cães do grupo anêmicos e do grupo não anêmicos, dos grupos machos e fêmeas, e com idade entre 1 e 12 meses e de cães acima de 12 meses, para população de positivos e negativos para hemoplasmas.

POPULAÇÃO (n)	Ht Min (%)	Ht Max (%)	Ht Méd (%)	Desvio padrão
GAPDH (94)	11	59	29,88	11,10
Anêmicos (64)	11	36	24,48	7,02
Não Anêmicos (30)	26	59	41,40	9,32
Machos (46)	13	53	29,87	10,77
Fêmeas (48)	11	59	29,90	11,53
Até 12 meses (18)	14	49	28,67	8,57
> 12 meses (76)	11	59	30,17	11,65
Positivos (16)	12	53	29,06	12,99
Negativos (78)	11	59	30,05	10,76

Ht – Hematócrito, % - Porcentagem

**TABELA 04** – Valores mínimos, máximos, media e desvio padrão da idade, em meses, de cães da cidade de Curitiba analisados para presença do gene gapdh, dos cães do grupo anêmicos e do grupo não anêmicos, dos grupos machos e fêmeas, e com idade entre 1 e 12 meses e de cães acima de 12 meses, para população de positivos e negativos para hemoplasmas.

POPULAÇÃO (n)	Idade Min (meses)	Idade Max (meses)	Idade Méd (meses)	Desvio padrão
GAPDH (94)	1	180	74,40	51,36
Anêmicos (64)	2	180	86,55	48,34
Não Anêmicos (30)	1	156	48,50	48,62
Machos (46)	1	180	77,02	50,89
Fêmeas (48)	2	180	71,90	52,22
Até 12 meses (18)	1	10	4,00	2,35
> 12 meses (76)	15	180	91,08	42,41
Positivos (16)	3	168	12,2	48,8
Negativos (78)	1	180	73,32	52,11

